



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **58063388 A**(43) Date of publication of application: **15.04.83**

(51) Int. Cl.

C12N 9/16
///(C12N 9/16 , C12R 1/01), (C12N
9/16 , C12R 1/03)

(21) Application number: **56161076**(22) Date of filing: **12.10.81**(71) Applicant: **MEITO SANGYO KK**

(72) Inventor: **KOKUSHO SUMITAKA**
KATO SHIGEAKI
MACHIDA HARUO

(54) PREPARATION OF PHOSPHOLIPASE D**(57) Abstract:**

PURPOSE: To obtain phospholipase D useful as a reagent for research, etc. efficiently, by cultivating a microorganism belonging to the genus *Nocardiopsis* capable of producing phospholipase D in a medium, collecting phospholipase D from the culture.

CONSTITUTION: A novel strain belonging to the genus *Nocardiopsis* NO 779 (FERM-P 6133) separated from soil is cultivated in a nutrient medium under aerobic conditions about 20W35°C for about 1W3 days. A solid

substance is filtered off from the culture solution, the culture solution is treated by a proper combination of salting-out, dialysis, ion chromatography, absorption chromatography, gel filtration, precipitation at isoelectric point, etc., so that phospholipase D contained in the filtrate is separated and purified. Phospholipase D is an enzyme to decompose an ester bond of phosphoric acid of glycerophospholipid and a nitrogen-containing base and to liberate phosphatidic acid and a base.

COPYRIGHT: (C)1983,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—63388

⑪ Int. Cl.³
C 12 N 9/16
// (C 12 N 9/16
C 12 R 1/01)
(C 12 N 9/16
C 12 R 1/03)

識別記号

庁内整理番号
7236—4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)4月15日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑭ ホスホリパーゼDの製造法

日野市多摩平6—10—4

⑮ 特 願 昭56—161076

⑯ 発 明 者 町田晴夫

日野市旭が丘2—24—4

⑰ 出 願 昭56(1981)10月12日

⑰ 出 願 人 名糖産業株式会社

⑱ 発 明 者 国生純孝

名古屋市西区笹塚町2丁目41番
地

国立市谷保7026—3

⑲ 発 明 者 加藤重昭

⑳ 代 理 人 弁理士 坂田順一

明 細 書

1. 発明の名称

ホスホリパーゼDの製造法

2. 特許請求の範囲

ノカルディオブシス属に属するホスホリパーゼD生産菌を培地に培養し、培養物からホスホリパーゼDを採取することを特徴とするホスホリパーゼDの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物によるホスホリパーゼDの製造法に関するものである。すなわち、本発明はノカルディオブシス (Nocardiosis) 属に属するホスホリパーゼD生産菌を培地に培養し、培養物からホスホリパーゼDを採取することを特徴とするホスホリパーゼDの製造法である。

ホスホリパーゼD (E.C. 3.1.4.4) は、グリセロ磷脂質のリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解し、ホスファチジン酸と塩基とを遊離する酵素である。またホスホリパーゼDは、エタノール、グリセロール、エタノールアミン等のアルコ

ール基を有する化合物の共存下で、グリセロ磷脂質に作用させると、ホスファチジン酸をアルコール基へ転移することも知られている。

ホスホリパーゼDは、キャベツ、ニンジン等の植物界に広く存在することが古くより知られ、主としてキャベツの組織中より抽出して製造されている。又、最近では、微生物によるホスホリパーゼDの製造方法として、ストレプトマイセス属 (特公昭52—399/8号公報) や、ミクロモノスポラ属 (特開昭54—44094号公報) に属する放線菌を用い、発酵法により製造する方法が知られている。

ホスホリパーゼDは、磷脂質の代謝に関連する研究用試薬や血清中に含まれるリン脂質の定量用試薬等に利用される他、各種リン脂質よりのホスファチジン酸製造にも利用出来る。

本発明者等は、自然界の土壤中より広く微生物を分離し、ホスホリパーゼDを生産する菌株を検索した。その結果、東京都八王子市の土壌より分離した菌株 (ノカルディオブシス属 NO 779 と称

する)を培地に培養すると、培地中にグリセロ磷脂質に作用してホスファチジン酸と塩基とを遊離する作用がある酵素が生成されることを確認し、本菌がホスホリパーゼDを生産することを見出した。またこの酵素を、エタノール、ソルビトール、エタノールアミン、グリセロール等の適当なアルコール基を有する化合物の共存下で、グリセロ磷脂質に作用させた場合、ホスファチジン酸をアルコール基へ転移することも認められた。

上記菌株の菌学的性状は次に示す通りである。

(a) 形態

グルコースアスパラギン寒天、グリセリンアスパラギン寒天、酵母麦芽寒天培地等では良好に、また澱粉無機塩培地では中程度に生育して気菌糸の集落を着生する。

胞子を着生した菌叢の色は培地の種類、観察時期により若干変化するが、おおむね白色ないし灰白色から明るい灰色を呈する。

シュートロス硝酸塩寒天、栄養寒天、オートミール寒天培地では気菌糸を着生しないか、貧弱に

しか着生しない。

寒天培地上に生育させた本菌株を顕微鏡で観察すると、気菌糸は $0.5 \sim 0.8 \mu$ で直線状でゆるく波形又は屈曲を混じえながら分枝をもつて長く伸び、気菌糸全体は数10から1000以上のすべて胞子からなる連鎖によつて形成されている。

胞子の大きさは $0.5 \sim 0.8 \times 0.7 \times 1.0 \mu$ で、ほぼ短円筒形で大きさはやや不規則である。

基生菌糸は $0.5 \sim 0.8 \mu$ で分枝をもつて伸長し、寒天培地上ではかならずしも分断しないが、液体培養することによりほとんどの場合細かく分断する。

しかし遊走胞子、胞子のう、菌核等は形成されない。

(b) 各種培地上での性状

以下に記載する実験方法は主としてイー・ビー・シャーリング(Int. J. Syst. Bacteriol. 16巻, 313~340, 1966年)の方法にしたがって行つた。

色調は「色の標準」(財団法人日本色彩研究所,

1964年)を用いて決定し、色相名とともに括弧内に色相名、彩度番号、明度番号の順に色相記号を記入した。

培養は25℃で行い、最も生育の旺盛な2~3週間目の各培地における観察結果を第1表に示した。但し第1表中、生育項目に記載した基生菌糸表面の色は胞子着生前の培養一週間目における観察結果を示しており、胞子着生が早く基生菌糸表面の色の判定困難な培地については、記載していない。

第

1

表

シュクロース・硝酸塩寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	薄く貧弱に発育、無色 グレイーウイシユ・ホワイト(19) かすかに着生、無色 生産しない
グルコース・アスパラギン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育、イエローウイシユ・ホワイト(Y-1-19) イエローウイシユ・グレイ(rY-2-19) 綿状に豊富に着生、ライト・ブラウンウイシユ・グレイ(rO-1-17) 生産しない
グリセリン・アスパラギン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育 ベイル・イエロー(rY-3-19) うすい綿状に着生、ライト・グレイ(18) 生産しない
デンプン・無機塩寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育、イエローウイシユ・グレイ(Y-1-19) イエローウイシユ・グレイ(rY-1-19) 粉状に中程度着生、グレイウイシユ・ホワイト(19) 生産しない

チロシン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育、イエローウイシユ・ブラウン(YO-3-16) ライト・ブラウン(O-3-15) 豊富に着生、ライト・グレイ(18) メラニン様、ブラウン色素を生ずる
栄 養 寒 天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	貧弱に発育、無色 ブラウンウイシユ・ホワイト(YO-1-19) 着生せず 生産しない
酵母・麦芽寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育 ダル・イエローオレンジ(YO-4-18) 豊富に着生、グレイウイシユ・ホワイト(19) メラニン様、ブラウン色素を生ずる
オートミール寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	中程度に発育、イエローウイシユ・グレイ(Y-1-19) イエローウイシユ・グレイ(Y-1-19) 貧弱に着生、ホワイト(20) 生産しない

(c) 生理的性質

①生育温度：5℃～30℃附近で生育し、20～30℃で最もよく生育する。

②ゼラチンの液化：液化しない（グルコース・ペプトン・ゼラチン培地上、25℃、3週間培養）。

③スターチの加水分解：分解する（スターチ寒天培地上、25℃、3週間培養）。

④脱脂牛乳の凝固、ペプトン化：凝固、ペプトン化共にせず（30℃、3～4週間培養）。

⑤メラニン様色素の生成：ペプトンイースト鉄寒天、チロシン寒天で生成する（25℃、2～4日間）。

(d) 炭素源の同化性（30℃、10～16日培養）

L-アラビノース	—	シュクロース	—
D-キシロース	—	イノシトール	—
D-グルコース	+	L-ラムノース	—
D-フラクトース	—	ラフィノース	—

(e) 細胞の化学分析

本菌株のデアミノビメリン酸はメソ型であ

り、ヒドロキシデアミノビメリン酸を含まない。

細胞壁の糖組成は、アラビノース、キシロース、マデユロース、ラムノース等を有せず、ガラクトース、マンノース等を有する。又本菌株はノカルドミコール酸を有しない。

以上の分析結果について Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology 第8版、657頁～658頁（1974年）や、レシエバリエ（Inter. J. System. Bacteriol. 20巻、435頁～443頁、1970年）、メイヤー（Int. J. Syst. Bacteriol. 26巻、487頁～493頁、1976年）らの分類法にしたがつて判定すると、本菌は細胞壁類型（cell wall type）III型、糖組成類型（cell wall sugar pattern）C型となる。

以上本菌は、細胞壁類型がIII、糖組成類型がCであることから、レシエバリエの分類法によればダソンビレイタイプのアクチノマデューラ属、サーモアクチノミセス属、アクチノビイフィダス属、ゲオダーマトフィラス属のいづれかに属する。

しかし本菌は、その形態において気菌糸のすべてが胞子の長い連鎖から成り、基生菌糸を細かく分断するが、内生胞子、遊走胞子、胞子のうが見い出されないことより、ダソンビレイタイプのアクチノマデューラ属（Genus Actinomadura dassonvillei type）に同定するのが分類上妥当である。なお、近年ダソンビレイタイプのアクチノマデューラ属はメイヤー^の提起した新属ノカルデイオブシス属に統合され、ノカルデイオブシス属の名称で取り扱われることが一般的である。

そこで本菌は、ノカルデイオブシス属 NO 779（Genus Nocardiopsis sp NO 779）と称することにした。そして本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は「微工研菌寄第6ノ33号」である。

本発明における使用菌としては、ノカルデイオブシス属 NO 779および本菌株を変異処理した変異株だけでなく、ノカルデイオブシス属（旧属名アクチノマデューラ ダソンビレイタイプ属）に属しホスホリパーゼDを生産する菌であれば全て

用いることが出来る。

本発明を実施するに当り、その培養形態としては、液体培養、固体培養いづれも用いることが出来るが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。

また使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩、及びその他の微量栄養素の他、ノカルデイオブシス属に属する微生物の利用することの出来る栄養源であれば、すべて使用することが出来る。

培地の炭素源としては、例えばブドウ糖、果糖、シヨ糖、乳糖、澱粉、グリセリン、デキストリン、糖蜜、ソルビトール等の他、脂肪酸、油脂、粗レシチン、アルコール、有機酸などが単独^でまたは組合せて用いられる。

窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源いづれでも利用可能であり、無機窒素源としては、例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、磷酸1アンモニウム、磷酸2アンモニウム、塩化アンモニウム等が挙げられ、また有

機望素源としては、大豆、米、とうもろこし、綿実、菜種、小麦などの粉、糠、脱脂粕をはじめ、コンスチーブリカー、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン、アミノ酸等が用いられる。

無機塩及び微量栄養素としては、例えばリン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、アルミニウム、カルシウム、マンガン、亜鉛等の塩類の他、ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等菌の生育やホスホリパーゼDの生産を促進する物であれば、必要に応じて使用出来る。

培養は好氣的条件で行なわれる。培養温度は菌が発育し、ホスホリパーゼDを生産する温度範囲で適宜変更出来るが、特に好ましいのは20〜35℃である。

培養時間は条件により異なるが、ホスホリパーゼDが最高生成量に達するまで培養すればよい。液体培養の場合は通常1〜3日程度である。

培養物中に生成したホスホリパーゼDは、液内培養では主として培養液中に溶けているので、培養終了液より固形物を分別して得られる培養液

よりホスホリパーゼDを採取する。

培養液中よりホスホリパーゼDを採取するに当つては、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。例えば硫酸、食塩等による塩析、アセトン、エタノール、メタノール等の有機溶剤による沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過、吸着剤、等電点沈殿等の方法が使用出来る。さらにこれ等の方法を適当に組み合わせることによつて、ホスホリパーゼDの精製効果が上る場合には、組合せて行うことが出来る。

これ等の方法により得られる酵素は、安定化剤として各種塩類、糖質、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加えるか、もしくは加えることなく減圧濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥等の方法により液状又は固形のホスホリパーゼDにすることが出来る。

ホスホリパーゼDの酵素活性測定法は、基質グリセロ磷脂質に作用してリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解して生ずる塩基の量を測定して求める。ホスホリパーゼDの活性は、特に記載

しないかぎり、以下に記載するコリンオキシダーゼ法により測定した。

力価測定法：

1%卵黄精製レシチンエマルジョン(0.1gレシチン、1mlエチルエーテル、10ml蒸留水の超音波乳化液)0.1mlに、0.2M pH7.2トリス-塩酸緩衝液0.1ml、0.1M CaCl₂水溶液0.05ml、蒸留水0.15mlを混合し、これに酵素液0.1mlを加え、37℃で20分反応後、50mM EDTA-2Naを含む1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)0.2mlを加え、直ちに5分間煮沸して反応を完全に停止する。次にコリンエステラーゼ測定用試薬(日本商事(株)製造)のキットに含まれるコリン呈色剤を呈色溶解液に溶解した溶液4mlを加え、37℃で20分間反応させた後、500nmの吸光度を測定する。

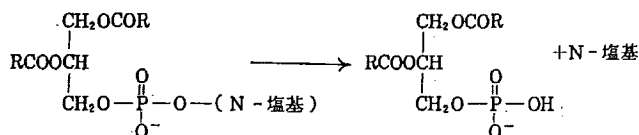
対照としては、あらかじめ熱失活した酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定する。

そして1時間に1μモルのコリンを遊離する酵素活性を1単位とする。

次に実施例3に記載した方法により精製した酵素標品を用いたホスホリパーゼDの理化学的性質について述べる。

① 作用

グリセロリン脂質のリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解してホスファチジン酸と塩基を遊離する。



② 基質特異性

基質としてレシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリンのいずれか1つを0.5μモル含むエマルジョン0.1mlを用い、蒸留水の代わりに1% Triton X-100を含む水溶液を用いる以外は、上記力価測定法と同様にして反応させ遊離したコリン量を測定し、各基質に対するホスホリパーゼD活性を測定した。その結果、レシチンに対する活

性を100とした時の相対活性は、リゾレシチン4.9、スフィンゴミエリン0.3であつた。

③至適 pH

力価測定法において用いる緩衝液の代りに pH 3.0~4.0では蟻酸・蟻酸ソーダ緩衝液、pH 4.0~5.5では酢酸・酢酸ソーダ緩衝液、pH 5.5~8.5ではトリス・マレイン酸・苛性ソーダ緩衝液、pH 7.0~9.0ではトリス・塩酸緩衝液、pH 9.0~10.0ではグリシン・苛性ソーダ緩衝液を用いてホスホリパーゼDの活性を測定し、至適 pH を求めた。また同測定法で用いる蒸留水0.15 mlの代りに1% Triton X-100 (和光純薬)水溶液0.15 mlを用いた時の至適 pH についても求めた。

その結果は第1図に示す通りで、蒸留水を用いた場合の至適 pH は6.5~7.0付近であり、1% Triton X-100水溶液を用いた場合の至適 pH は5.0付近に認められた。

④至適温度

力価測定法において、反応温度条件を10, 20,

25, 37, 40, 50, 55, 60, 70,

80および90℃で酵素活性を測定した。その結果は第2図に示す通りであつて、至適温度は60℃から80℃の範囲であると認められる。

⑤ pH 安定性

酵素溶液0.1 mlに0.2 mlの0.1 Mの各種緩衝液、すなわち pH 3.0~3.5ではグリシン・塩酸緩衝液、pH 3.5~7.0では酢酸・酢酸ソーダ緩衝液、pH 5.0~8.0ではトリス・マレイン酸・苛性ソーダ緩衝液、pH 7.0~9.0ではトリス・塩酸緩衝液、pH 9.0~9.5ではグリシン・苛性ソーダ緩衝液を夫々加え、25℃で2時間保つた。その後、これら酵素緩衝液に0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.2) 1.2 mlを加え、pH を7.0~7.3とした。この溶液0.1 mlを用い、力価測定法に従つて力価を測定し、安定 pH 範囲を調べた結果、第3図に示した通り本酵素の特に安定な pH 範囲は4.0~7.0であると認められた。

また力価測定法で用いる蒸留水0.15 mlの代

りに1% Triton X-100水溶液0.15 mlを用いる他は、上記と同様に操作して pH 安定範囲を調べたが、結果は第3図と殆んど変らなかつた。

⑥熱安定性

酵素溶液0.1 mlに0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.2) 4 mlを加え、20, 30, 37, 40, 50, 60および65℃に30分間放置した後、残存する酵素活性を測定した。その結果は第4図に示す通りで、30℃で30分の熱処理では殆んど失活せず、50℃で30分の熱処理で80%の活性が残存した。

⑦各種物質による影響

力価測定法において CaCl₂水溶液の代りに各種物質の水溶液を0.05 ml加え、酵素反応系中で1 mM 濃度に成るようにして活性を測定した。その結果は水添加の時の活性を100とし、相対活性として賦活作用のあつた物は、例えば AlCl₃、CuSO₄、ZnSO₄、CoCl₂、CaCl₂、FeCl₃、FeSO₄、MgCl₂、SnCl₂、デオキシコール酸ソーダ、Triton X-100等であり、一方阻害作用のあつたもの

としてはドデシル硫酸ソーダ、セチルピリジニウムクロライド等である。

⑧力価の測定法

前述したとおりである。

⑨精製方法

前述したとおりであり、その具体例は実施例3に記載のとおりである。

⑩等電点

4.85±0.1 (アンホライン電気泳動法により測定)

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれによつて制限されるものではない。

実施例 1

脱脂小麦胚芽10gに硫安0.1g、ペプトン0.1g、及び水8 mlを500 ml容三角フラスコに入れ、121℃で15分間蒸気殺菌後、ノカルデイオプシス属 NO 779 の胞子水懸濁液2 mlを接種した。そして培養温度25℃で静置30日間培養した。

培養終了後、100 mlの水を加えてホスホリパーゼDを抽出した後、固形物を分別し、汁液中のホスホリパーゼDの活性を測定した。その結果は3.5 u/mlであつた。

実施例 2

シード培地として澱粉1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.25%、ペプトン0.25%、 K_2HPO_4 0.2%、 MgSO_4 0.01%を含む水溶液培地(pH 6.8)100 mlを500 ml坂口フラスコに入れ、蒸気殺菌後、ノカルディオバシス属NO 779菌株の胞子を一白金耳接種し、培養温度30℃、120回転/分で2日間振盪培養しシード培養液を得た。

つぎに本培地すなわちグルコース1.0%、コーンステープリカー1.0%、ペプトン0.5%、粉末酵母エキス0.1%、 NH_4NO_3 0.5%、 K_2HPO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%からなる培地(pH 6.0)50 mlを500 ml容坂口フラスコに入れ、121℃で10分蒸気殺菌後、シード培養液5 mlを移植し、25℃で2日間培養した。

培養後、遠心分離して固形物を除去し、培養汁

液50 ml(5.2 u/ml)を得た。これに硫酸22.7 gを攪拌しながら徐々に加えてホスホリパーゼDを沈澱させた。遠心分離により沈澱を集め、0.02 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)に溶解してホスホリパーゼD活性を測定した。

この時の培養汁液に対するホスホリパーゼDの活性回収率は56%であつた。

実施例 3

きな粉3.0%、コーンステープリカー1.0%、ペプトン0.5%、粉末酵母エキス0.1%、 NH_4NO_3 0.5%、 K_2HPO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、ツウイン(Tween) - 85 0.1%から成る培地(pH 6.0)約1.5 lを30 lジャーファーマンターに入れ、120℃で15分間滅菌後、実施例2に記載したシード培養液1.5 lを植菌し、27℃で40時間培養を行つた。

培養後、菌体固形物を遠心分離により除去し、遠心上清13 l(32.2 u/ml)を得た。この遠心上清を5℃に冷却した後、-20℃のアセト

ンを加えてアセトン濃度30~70%面分に相当するホスホリパーゼDを含む沈澱物を遠心分離により集めた。この沈澱物をpH 6.0トリス-マレイン酸に溶解し、0.02 Mの同緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースに通塔し、通過区分を集めた。次に堀内等の方法(J. Biochem. 81, 1639(1977))で調整したバルミトイルガーゼをカラムに充填し、十分に水洗してから上記DEAE-セルロース通過液を注入し、活性を吸着した。これを0.05 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)で洗浄後、0.2% Triton X-100を含む同緩衝液を加え活性を溶出した。活性区分を集めてバイオエンジエリング社製の限外膜過膜(Type G-10 T)を用いて濃縮した後、ゲル濾過担体としてトヨパールHW-55F充填カラムに注入し、蒸留水を用いて通塔し、活性区分を集めて凍結乾燥を行つた。

この乾燥粉末を0.025 Mイミダゾール-塩酸(pH 7.4)に溶解後、ファルマシア・ファイ

ンケミカルス社製のポリバツファ交換体PBETM94(20 ml)充填カラムに通塔して活性を吸着後、同社製の溶出用ポリバツファ(pH 5.0)を用いてpH勾配により溶出した。溶出したホスホリパーゼDの活性区分を集めて限外膜過膜にて濃縮し、セフアデックスG-75充填カラムに通塔し、ホスホリパーゼD活性区分を集めて凍結乾燥した。かくして約40%の活性回収率でホスホリパーゼDを回収し、この時の比活性は10700 u/mg蛋白質であつた。

4. 図面の簡単な説明

図面は本発明方法によつて得られるホスホリパーゼDに関するもので、第1図は至適pHを示す曲線、第2図は至適温度を示す曲線、第3図はpH安定性を示す曲線、第4図は熱安定性を示す曲線である。

出願人 名糖産業株式会社

代理人 弁理士 坂 田 順 一



图 1

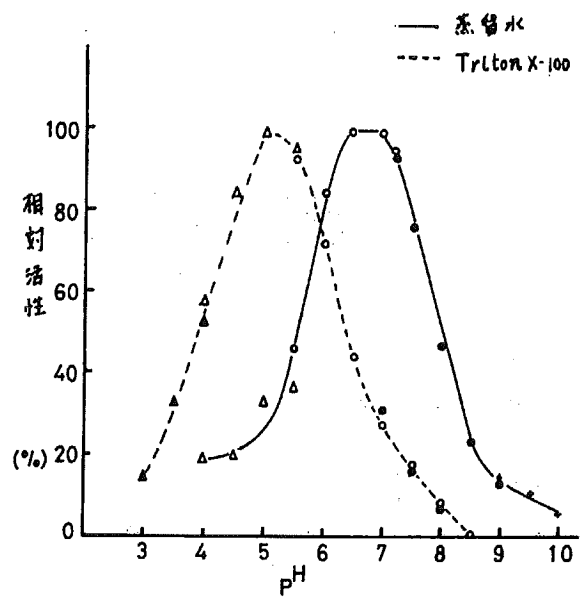


图 2

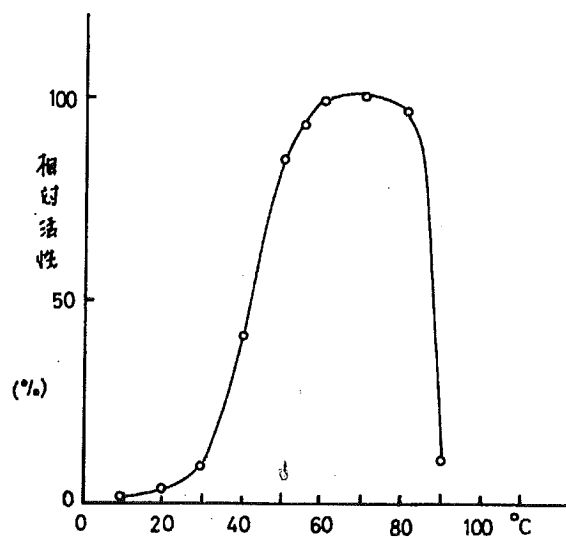


图 3

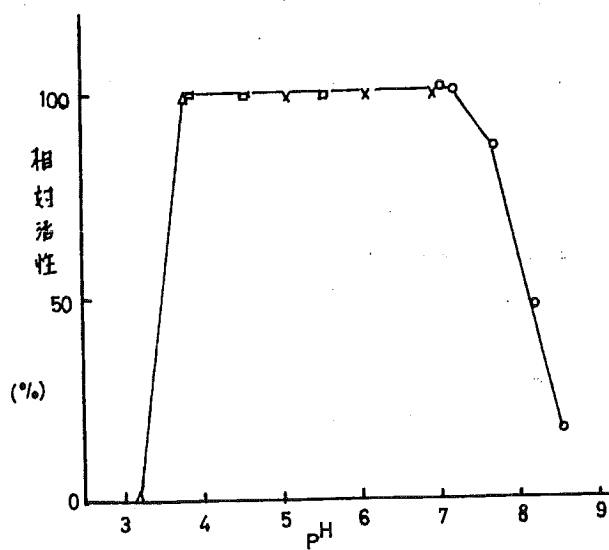
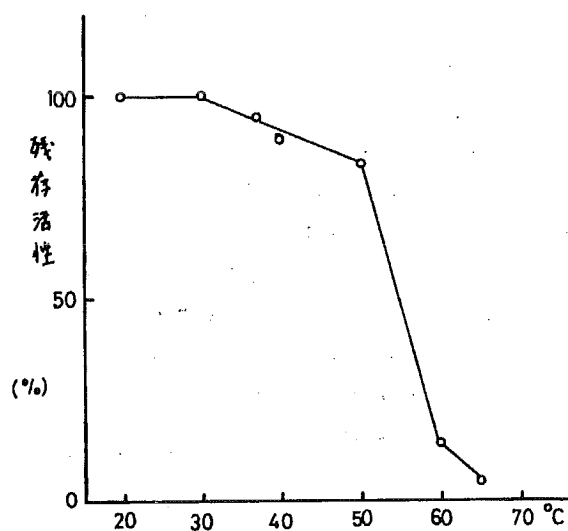


图 4



手 続 補 正 審

昭和58年 / 月 7 日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第161076号

2. 発明の名称

ホスホリパーゼDの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 愛知県名古屋市中区笹塚町2丁目4番地

名 称 糖 産 業 株 式 会 社

代表者 篠 田 晃

4. 代 理 人

住 所 郵便番号 171

東京都豊島区南池袋二丁目1番5号(英ビル)

氏 名 (6946)弁理士 坂 田 順 一

電 話 (984) 20-23

特許庁

58.1.7

出願第2号

- 1 -

してもレシチン以外のジアシルエステル型、モノアシルエステル型、プラスマローゲン型、シクロアルキリデン型、ジアルキルエーテル型、モノアルキルエーテル型の α -グリセロリン脂質、及び β -グリセロリン脂質が用いられ、またスフィンゴリン脂質もよい基質となる。

転位の起るアルコールとしては次の分類ものがあげられる。

A. 1級アルコール

(1) 炭素数1から22までの脂肪族アルコール及びそれに第1級、第2級、第3級アミン、ハロゲン、水酸基、カルボン酸とそのエステル、エーテル、アルデヒド、ケトン等の置換基を有するもの

(2) ペントース、ヘキソース及びそれにアミノ基、酸アミド等の置換基を有するもの

(3) 糖アルコール及び多価アルコール

(4) 二糖類

(5) 芳香族アルコール及びそれにアミノ基、ハロゲン、カルボン酸等の置換基を有するもの

5. 補正命令の日付

自 発 補 正

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第18頁第19行の『デオキシコール酸ソーダ、Triton』を次のように訂正します。

『デオキシコール酸ソーダ、エタノール、イソプロパノール、 t -ブタノールの如き第1級、第2級、又は第3級アルコール、Triton』

(2) 明細書第19頁第10行と第11行の間に次の文章を挿入します。

『④転位作用

キャベツのホスホリパーゼDはレシチンからホスファチジン酸を生成し、これを炭素数1から6までの直鎖の1級アルコールに転位してエステルを形成することが知られている。本酵素についても同様に転位作用を調べた結果、本酵素では更に広範囲のアルコールに転位が起りエステルが形成することが判明した。基質となるリン脂質と

(6) 脂環式アルコール

(7) 炭素多環式アルコール

(8) フラン環、フタルイミド環、ピロール環、インドール環、ビリジン環、モルホリン環、ピリミジン環、ピペラジン環、イミダゾピリミジン環等の複素環アルコール

B. 第2級アルコール

(1) 炭素数1から10までの脂肪族アルコール及びそれに各種置換基を有するもの

(2) 芳香族アルコール

(3) 脂環式アルコール

これらの基質とアルコールを組合わせて転位作用が起つたかどうかを調べた結果が第2表である。第2表では、転位物(エステル)の生成が認められたものを+、少量の生成があつたものを±、生成の認められなかつたものを-で示した。また各アルコールの前の記号は上記アルコールの分類番号を示す。これと同様の検査を市販のキャベツから得られたホスホリパーゼDを用いて行つたが、転位物(エステル)の生成したものは全くなかつた。

次に転位作用の実験方法を述べる。

0.4 M、pH 5.7 酢酸緩衝液 0.1 ml、0.1 M CaCl₂ 水溶液 0.05 ml、ホスホリパーゼ D 250 単位を含む酵素液 0.1 ml、1 g リン脂質 エマルジョン (0.1 g リン脂質、1 ml エーテル、10 ml 蒸留水の超音波乳化液) 0.1 ml 及び 10 % アルコール溶液 (溶解度に応じて水、エーテルまたはアセトンを用いる) 0.15 ml を混合し、37℃ で 1~5 時間反応させた。反応終了後、50 ミリモルの EDTA を含む 1 モル、pH 8.0 のトリス塩酸緩衝液 0.2 ml とクロロホルム-メタノール混液 (2:1) 5 ml を加え、混合して転位生成物 (エステル) を抽出した。静置後、下層を分取し、減圧乾燥後少量のクロロホルム-メタノール混液 (1:1) に溶かし、薄層クロマトグラフィーにて転位生成物 (エステル) の検出を行つた。その結果を第 2 表に示す。

第 2 表

アルコールの 分類記号	リン脂質 アルコール	レシチン	リゾレシチン	β , γ -ジヘキサデシル L- α -レシチン	スフィンゴ ミエリン
A-(1)	1-デカノール	+	+	+	+
	1,6-ヘキササンジオール	+	+	+	NT
	セリエチルエステル	+	-	+	+
	パントテニルアルコール	+	±	+	+
A-(2)	リボース	+	-	+	±
	グルコース	+	-	+	±
	グルコサミン	+	-	+	+
A-(3)	ソルビトール	+	-	NT	NT
	モノラウリン	+	NT	+	+
A-(4)	サッカロース	+	-	NT	-
A-(5)	β -ヒドロキシエチルア ニリン	+	+	+	+
A-(6)	1,4-ジヒドロキシメチ ルシクロヘキサン	+	-	+	NT
A-(7)	ナフタリンエタノール	+	+	+	NT
A-(8)	ピリドキシン	+	+	+	+
	チアミン	+	+	+	+
	アデノシン	+	-	+	+
B-(1)	1-アミノ-2-プロパノール	+	+	+	+
	イソプロパノール	+	+	+	±
B-(2)	1-フェニル-2-プロパノール	+	-	+	NT
B-(3)	シクロヘキサノール	+	-	+	+

(注) NT: 試験を行なわなかつた